

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**CAROLINE PONCINI OLIVEIRA**

**CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS, TERMOTOLERANTES E MESÓFILOS  
AERÓBIOS TOTAIS EM LEITE CRU, SORO-FERMENTO E QUEIJO MINAS  
ARTESANAL EM DIFERENTES TEMPOS DE MATURAÇÃO PRODUZIDO NA  
REGIÃO DO CERRADO**

**PATOS DE MINAS – MG  
DEZEMBRO DE 2020**

**CAROLINE PONCINI OLIVEIRA**

**CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS, TERMOTOLERANTES E MESÓFILOS  
AERÓBIOS TOTAIS EM LEITE CRU, SORO-FERMENTO E QUEIJO MINAS  
ARTESANAL EM DIFERENTES TEMPOS DE MATURAÇÃO PRODUZIDO NA  
REGIÃO DO CERRADO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas**

**Coorientadora: Carla Ferreira de Lima**

**PATOS DE MINAS – MG**

**DEZEMBRO DE 2020**

**CAROLINE PONCINI OLIVEIRA**

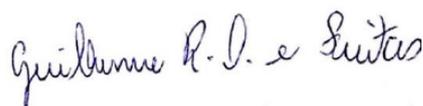
**Contagem de coliformes totais, termotolerantes e mesófilos aeróbios totais em leite cru, soro-fermento e Queijo Minas Artesanal em diferentes tempos de maturação produzido na região do Cerrado**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas**

**Coorientadora: Carla Ferreira de Lima**

Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Guilherme R. O. e Freitas – IBTEC/UFU  
Presidente



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Milla Gabriela dos Santos - FEQUI/UFU  
Membro



---

Dr<sup>ª</sup> Daiane Silva Resende  
Membro

Patos de minas, 03 de dezembro de 2020

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Guilherme, primeiramente pela confiança e oportunidade de realizar esse trabalho que me trouxe muito conhecimento e me deixou ainda mais fascinada pela microbiologia. Por toda paciência durante a realização da pesquisa, pelos ensinamentos e dedicação a esse trabalho. E por ser sem dúvidas um dos melhores professores que eu pude ter durante a graduação. Muito obrigada!

À minha parceira de vida e de laboratório Bárbara que me acompanhou em todos os momentos, por todo companheirismo, apoio e por ser a melhor amiga que eu poderia ter.

À minha mãe e meu pai, que sempre me deram muito apoio e amor.

Ao Astolfo, meu filho de quatro patas, por sempre ser um grande companheiro.

Às minhas amigas Isabela, Isabelle, Luciana e Mariana, pela amizade sincera e carinho durante todo esse processo, vocês foram essenciais para mim durante todo esse período.

Ao André por sempre estar presente, por me ajudar e me escutar mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos professores da UFU Patos de Minas, todos excelentes profissionais, em especial os professores Aulus e Gilvan e a professora Terezinha, pelas aulas mais incríveis que eu já tive e por todo conhecimento que me proporcionaram durante a graduação.

## RESUMO

O Queijo Minas Artesanal (QMA), é um alimento amplamente consumido no Brasil, sendo sua produção feita de maneira artesanal, a partir do leite cru ordenhado na própria propriedade rural, com adição do fermento natural, também conhecido como “pingo”, e sal, mantendo-se assim uma tradição secular. Apesar de ser um alimento muito valorizado e apresentar grande número de consumidores em todo país, o modo de produção utilizado na elaboração desse alimento pode trazer riscos à saúde dos consumidores veiculando microrganismos potencialmente patogênicos ou suas toxinas, se boas práticas de fabricação não forem adotadas. Para determinar a qualidade e inocuidade do QMA produzido na microrregião do Cerrado, amostras de queijo de diferentes dias maturação, de leite cru e de soro-fermento, foram coletadas para a realização de análises microbiológicas. Amostras de QMA, pertencentes a um mesmo lote de fabricação, foram avaliadas em 1,7, 10, 14 e 22 dias após a sua produção com o objetivo de evidenciar o efeito do período de maturação na contagem de microrganismos dos grupos Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e Mesófilos aeróbios totais.

**Palavras-chave:** Análise microbiológica. Contaminação. Qualidade alimentar. Queijo Minas Artesanal.

## **ABSTRACT**

*Minas Artisanal cheese (QMA), is a food widely consumed in Brazil, and its production is made by hand, from raw milk expressed on the farm itself, with the addition of natural yeast, also known as “pingo”, and salt, thus maintaining a secular tradition. Despite being a highly valued food and presenting a large number of consumers all over the country, the production method used in the preparation of this food can bring risks to the health of consumers by transmitting pathogenic microorganisms or their toxins, if, good manufacturing practices not main adopted. To determine the quality and food safety of the QMA produced in the Cerrado micro-region, samples of cheese from different maturation days, raw milk and fermented whey were collected for microbiological analysis. Samples of QMA, belonging to the same batch of manufacture, were evaluated 1, 7, 10, 14 and 22 days after their production in order to show the effect of the maturation period on the quantification of microorganisms Total coliforms, Thermotolerant coliforms and Mesophilic Aerobic Bacteria.*

**Keywords:** *Microbiological analysis. Contamination. Food quality. Minas Artisanal cheese.*

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL: bactérias ácido lácticas  
BPF: boas práticas de fabricação  
°C : graus Celsius  
Caldo EC: caldo *Escherichia Coli*  
CBT: contagem bacteriana total  
*E.coli: Escherichia Coli*  
EMATER: Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural  
g: grama  
IMA: Instituto Mineiro de Agropecuária  
IPHAN: Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional  
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
MG: Minas Gerais  
mL: mililitro  
Nº: número  
PCA: Plate Count Agar  
pH : potencial hidrogeniônico  
QMA: Queijo Minas Artesanal  
UFC: Unidade Formadora de Colônia  
UFU: Universidade Federal de Uberlândia  
VBBL: Verde Brilhante Bile Lactose  
VRBA: Ágar cristal violeta bile lactose

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
1.1 Região do Cerrado .....	11
1.2 Produção de Queijo Minas Artesanal .....	12
1.3 Microbiota do Queijo Minas Artesanal.....	13
1.4 Microrganismos indicadores de contaminação alimentar.....	14
1.5 Análises microbiológicas .....	15
2 OBJETIVO .....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
3 MATERIAL E MÉTODO .....	18
3.1 Local de trabalho .....	18
3.2 Obtenção das amostras .....	18
3.3 Preparo das amostras .....	18
3.4 Análises microbiológicas.....	19
3.4.1 Contagem de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes.....	19
3.4.2 Contagem de Mesófilos aeróbios totais.....	20
3.5 Análise estatística .....	21
4 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	21
4.1 Coliformes totais (a 35 °C) e Coliformes termotolerantes (a 45 °C) .....	21
4.2 Mesófilos aeróbios totais .....	27
5 CONCLUSÃO .....	30
REFERÊNCIAS .....	32

## 1 INTRODUÇÃO

Em Minas Gerais, o Queijo Minas Artesanal (QMA) sobreviveu às pressões da modernização dos processos de produção, não só pelo apego às tradições, mas também pelo isolamento das propriedades produtoras espalhadas pelas colinas e pelos vales do Estado. Isso contribuiu para que se preservassem produtos com características próprias e de imenso valor cultural e econômico (EMATER, 2003). Fabricado nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serra da Ibitipoca, Serro e Triângulo Mineiro, a atividade é considerada como importante fonte de renda para muitos pequenos produtores (MINAS GERAIS, 2020).

Para que o queijo mineiro seja reconhecido como QMA deve-se manter o modo de produção artesanal, caracterizado pelo uso de leite cru (não pasteurizado), com a adição do soro-fermento natural, também conhecido como pingo, e prensado manualmente. Benquistado por uma grande quantidade de consumidores no país, devido a sua unicidade, o processo de produção do QMA foi reconhecido pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) como patrimônio cultural imaterial brasileiro (IPHAN, 2006). A permanência do processo de fabricação artesanal é responsável por manter as características únicas desse queijo, mas não garante a segurança do alimento e de seus consumidores caso as boas práticas de fabricação (BPF) não sejam aplicadas de maneira correta. Isso porque existe o risco de contaminação do produto, que acontece principalmente pelo uso do leite não pasteurizado, tempo de maturação inadequado e a intensa manipulação durante todo o processo de fabricação (MARTINS, 2006).

O consumo de queijos contaminados apresenta perigo para a saúde da população, tornando-se necessário a realização de estudos para avaliação da segurança desse alimento. A contagem de microrganismos indicadores de contaminação alimentar é considerada uma ferramenta bastante eficaz, uma vez que quando estes estiverem presentes fornecem informações importantes, sobre a qualidade do produto. Alguns dos microrganismos indicadores mais utilizados no estudo sobre qualidade de alimentos produzidos através de ingredientes de origem animal são os Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e os Mesófilos aeróbios totais (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A presença desses grupos de microrganismos está relacionada com a qualidade do leite utilizado na fabricação do queijo, ou com contaminações que podem ocorrer em qualquer etapa

do processo de fabricação, uma vez que é um produto muito manipulado (DORES, 2007). Além disso, esses microrganismos produzem enzimas que podem provocar alterações no leite, como degradação das gorduras e pode tornar o alimento impróprio para o consumo, tornando-o veículo de doenças (OLIVEIRA et al., 2008). Dessa forma para assegurar a saúde da população consumidora e auxiliar os produtores na fabricação de um QMA de boa qualidade torna-se necessária a avaliação microbiológica do queijo.

Com o objetivo de garantir a segurança dos consumidores, a qualidade do queijo artesanal, e a manutenção da tradição no modo de produção que envolve um grande número de produtores, medidas que englobam todo o processo da fabricação foram tomadas, incluindo a adoção de leis estaduais voltadas especificamente à fabricação do QMA e à realização de estudos sobre os métodos de fabricação, aspectos culturais e históricos. Após a edição da Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que criou normas e deu identidade ao QMA, a Secretaria de Agricultura Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais e a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais (EMATER-MG) lançaram o "Programa de Apoio aos Queijos Tradicionais de Fabricação Artesanal", que, além de buscar a melhoria da qualidade e da produtividade de todas as queijarias das regiões tradicionalmente produtoras, visa aproveitar e valorizar, de forma objetiva, o imenso potencial de mercado do queijo mineiro (EMATER, 2003).

No caso de queijos produzidos a partir de leite cru, além da manutenção das BPFs, um dos requisitos exigidos para comercialização e segurança de consumo é a maturação do produto, responsável pela redução da umidade do queijo, aumento da acidez e a concentração de sais, e reduzindo assim, o risco da presença de microrganismos potencialmente patogênicos (COSTA JÚNIOR et al., 2014). Além disso, a maturação também é responsável pelas características do queijo, como a textura, o sabor e o cheiro (SPERAT-CZAR, 2012).

Mesmo sendo reconhecida como patrimônio cultural, a comercialização do QMA sofreu com as exigências da legislação, que determinava um tempo mínimo de 60 dias de maturação para comercialização, período considerado muito longo, prejudicava economicamente os produtores e as características sensoriais desejadas nos queijos (SALES, 2015; PERRY, 2004).

No ano de 2013 essa problemática foi amenizada com a publicação da Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013 (BRASIL, 2013), que permitiu que pesquisas

científicas fossem realizadas com o objetivo de avaliar a segurança de consumo queijos artesanais durante o processo de maturação, e se comprovado que o queijo atende aos padrões exigidos por lei, poderia ser comercializado com tempo de maturação inferior a 60 dias. Após estudos técnico-científicos, a Portaria do IMA nº 1736, de 27 de julho de 2017 (MINAS GERAIS, 2017), estabeleceu que o tempo de maturação do QMA para comercialização em Minas Gerais, deveria atender ao período mínimo de maturação de 14 dias para a microrregião de Araxá, de 17 dias para a microrregião do Serro, e de 22 dias para as microrregiões da Canastra, do Cerrado, do Campo das Vertentes, de Serra do Salitre e do Triângulo Mineiro, até que sejam realizadas novas pesquisas. Entretanto, até o momento não existem estudos publicados que avaliam a segurança do alimento, QMA, produzido na microrregião do Cerrado, limitando sua comercialização com no mínimo 22 dias de maturação. De acordo com os produtores da região, durante o processo de maturação o QMA tem suas características sensoriais alteradas, e então deixam de apresentar as qualidades dos queijos mais frescos, procuradas por seus consumidores e por isso, seria importante este tipo de estudo que, além de garantir a segurança do alimento, pode proporcionar aos produtores a comercialização do seu produto de forma regularizada antes dos 22 dias de maturação, mantendo assim as características sensoriais dos queijos menos maturados.

Dessa forma, onze amostras de QMA de produtores da microrregião do Cerrado, selecionados pela EMATER de Patos de Minas, foram analisadas. Foram avaliados queijos de um mesmo lote de produção, em diferentes períodos de maturação (1, 7, 10, 14 e 22 dias), bem como amostras do leite cru e soro-fermento utilizados no processo de fabricação, para avaliar a concentração de Coliformes totais, termotolerantes e Mesófilos aeróbios totais.

### **1.1 Região do Cerrado**

Região conhecida anteriormente como Alto Paranaíba, apresenta clima tropical de altitude, e temperatura anual média de 22 °C. O período de maior pluviosidade normalmente acontece nos meses de outubro a março. Sobre a umidade relativa do ar, a região é caracterizada por apresentar baixa umidade no inverno e alta umidade durante o verão. A altitude média é de 700 m, o relevo possui trechos planos e ondulados contando com 25% de áreas montanhosas. Outra importante característica é que uma boa parcela da população é constituída por agricultores familiares, sendo o queijo artesanal e a pecuária leiteira suas principais fontes de renda (IPHAN, 2006).

O clima, as pastagens assim como as estruturas das formas de relevo fazem com que o QMA produzido no Cerrado apresente características únicas. A mesma tradição no modo de produção abrange os municípios de Abadia dos Dourados, Arapuá, Carmo do Paranaíba, Coromandel, Cruzeiro da Fortaleza, Guimarães, Lagamar, Lagoa Formosa, Matutina, Patos de Minas, Patrocínio, Presidente Olegário, Rio Paranaíba, Santa Rosa da Serra, São Gonçalo do Abaeté, São Gotardo, Tiros Varjão de Minas e Vazante. Em todas essas cidades existem produtores de QMA, e esses buscam atingir a diminuição do tempo de maturação exigido pela atual legislação por meio de pesquisas científicas que comprovem a segurança do consumo do queijo artesanal feito nessas localidades, e dessa maneira assegurar a qualidade e valorizar esse produto tradicional (EMATER, 2003; IPHAN, 2006).

## **1.2 Produção de Queijo Minas Artesanal**

A produção de QMA ainda segue bastante fiel à tradição secular, porém algumas modificações foram aderidas pelos produtores para melhorar a higiene durante o processo de manufatura e, assim, atingir tanto as exigências sanitárias quanto a aceitação e valorização do produto por parte dos consumidores. O queijo em Minas, sempre foi feito a partir do leite de vacas coagulado, antigamente o coagulante era produzido apenas de forma tradicional, feito com parte do estômago seco e salgado de bois ou cabritos. Hoje, o coagulante também é feito de forma industrial e as enzimas pepsina e renina são as responsáveis pelo processo de coagulação do leite (EMATER, 2003; IPHAN, 2006; IMA, 2007). O soro-fermento, também chamado de “pingo”, apresenta em sua composição bactérias lacto-fermentativas típicas de cada região, e é obtido a partir do soro que escoa dos queijos durante a dessoragem. Este é um dos ingredientes responsáveis por refletir no QMA as características específicas de cada local. Outras modificações adotadas por alguns produtores foram à substituição de bancas e fôrmas de madeira por bancas de ardósia e fôrmas plásticas, materiais fáceis de higienizar (FERREIRA, 2002). Existe também uma grande preocupação com as condições de higiene dos animais e com ambiente em que eles ficam alojados. Outros cuidados incluem a manutenção da higiene do local onde é realizada a ordenha e principalmente com os chamados “quartos de queijo” ou “queijarias”, local onde se faz os queijos e

ocorre o processo de maturação, que agora são construídos de maneira que se tornem ambientes de fácil manutenção da higiene (IPHAN, 2006).

De acordo com a Portaria do IMA nº 1.969, de março de 2020, as etapas da produção do QMA compreendem as seguintes fases: i) filtração do leite; ii) adição de cultura láctica e coalho; iii) coagulação; iv) corte da coalhada; v) mexedura; vi) dessoragem; vii) enformagem; viii) prensagem manual; ix) salga seca; x) maturação. Ainda, conforme com a Lei Estadual 20.549, de 18 de dezembro de 2012, a produção de QMA deve ser realizada no máximo após 90 minutos da ordenha; o leite utilizado para fabricação não pode sofrer tratamentos térmicos; e precisa ser proveniente de animais saudáveis, que não possuam sinais clínicos de doenças infectocontagiosas, com atestado de saúde que comprove a ausência de zoonoses. Além disso, todas as pessoas que trabalham em qualquer etapa da produção dos queijos devem apresentar atestado de saúde atualizado e utilizar equipamentos de proteção individual (EMATER, 2009).

### **1.3 Microbiota do Queijo Minas Artesanal**

A microbiota natural do leite cru e dos fermentos naturais empregados na manufatura do QMA é composta por bactérias ácido lácticas (BAL), que consiste em um grupo de microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos. Normalmente se desenvolvem em ambientes que possuem baixa concentração de oxigênio ou na ausência de oxigênio (BERESFORD et al., 2001). As BAL podem ser classificadas em homofermentativas ou heterofermentativas, sendo que as homofermentativas apresentam como produto final a glicose, e as heterofermentativas possuem como produto final principal o ácido láctico (SILVA, 2007). Quanto à temperatura de multiplicação, são classificadas em mesófilas que se desenvolvem em temperaturas próximas aos 30°C, e termófilas que se desenvolvem melhor em temperaturas superiores, próximas aos 40°C (EMBRAPA, 1995; FOX et al., 2000).

As BAL possuem um papel importante no aumento da vida útil dos queijos, pois, diminuem o pH do produto, tornando-o desfavorável ao crescimento de diferentes microrganismos potencialmente patogênicos. Além disso, produzem compostos flavorizantes e substâncias peptídicas que inibem o desenvolvimento de outras bactérias Gram-positivas. Os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, e *Enterococcus* são as BAL mais encontradas em QMA (EMBRAPA, 1995; GIANNINO et al., 2009). Entretanto, além de trazer benefícios, quantidades elevadas de BAL no queijo podem indicar problemas nas condições de higiene

durante o processamento, principalmente quando são encontradas grandes concentração de bactérias do gênero *Enterococcus*. (HAJDENWURCEL, 1998; SILVA, 2007).

#### **1.4 Microrganismos indicadores de contaminação alimentar**

A presença de microrganismos em um alimento não indica necessariamente que este é inviável para consumo ou possui baixa qualidade. O risco para os consumidores aparece quando o produto não é fabricado seguindo os critérios de higienização corretamente ou quando há falhas durante o processamento. Dessa forma, alimentos que não são produzidos, armazenados e transportados de forma correta estão susceptíveis a apresentar organismos que podem causar infecções e intoxicações aos consumidores (ICMSF, 2006).

Exemplo disso são as BAL presentes no QMA, muito importantes para garantir a manutenção das características sensoriais, assim como a qualidade do produto sem causar prejuízos para saúde. Mas, se acontecerem falhas em qualquer fase da produção desse alimento, a presença de microrganismos indesejáveis e a multiplicação exagerada de bactérias pode tornar esse alimento impróprio para consumo (BERESFORD e WILLIAMS, 2004).

Uma das principais fontes de contaminação do QMA é a ordenha, que se realizada de forma inadequada, leva à diminuição da qualidade do leite, matéria prima principal na elaboração desse alimento. É normal que o leite apresente microrganismos, mesmo quando coletado de vacas saudáveis e de forma higiênica. Mas para ser considerado de boa qualidade deve possuir uma contagem total de bactérias e de células somáticas baixa, ou seja, uma contagem total de bactérias que apresenta números altos indica que pode existir contaminação no leite (SCHERRER et al., 2004). No caso de uma contagem alta de células somáticas, há um indicativo de que o organismo do animal está com algum processo de inflamação, o que acontece em um quadro de mastite, por exemplo, (BOZO, 2013; SALES 2015).

Com isso, a avaliação de bactérias capazes de indicar a ocorrência de agentes contaminantes, se torna uma ferramenta muito importante na avaliação da qualidade de diversos alimentos (FOX et al., 2000). Existem diferentes agentes potencialmente patogênicos que podem se desenvolver em alimentos, quando produzidos ou armazenados de maneira irregular. Avaliar a presença de todos os possíveis

microrganismos contaminantes seria laborioso além de exigir alto custo de investimento, tornando-se inviável. Por isso, a avaliação de microrganismos que servem como indicadores da qualidade alimentar tornou-se uma metodologia de análise muito utilizada, tratando-se de uma técnica eficaz, de baixo custo e de rápida execução (ICMSF, 2006; HAJDENWURCEL, 1998).

Os microrganismos pertencentes aos grupos Coliformes totais, Coliformes termotolerantes e Mesófilos aeróbios totais, são considerados indicadores de contaminação alimentar, uma vez que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, provável presença de patógenos, deterioração alimentar, ou se as condições sanitárias foram seguidas de maneira adequada durante o processamento, produção e armazenamento dos alimentos (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

De acordo com a legislação vigente (MINAS GERAIS, 2018) o QMA para ser considerado próprio para consumo deve apresentar no máximo  $5,00 \times 10^3$  UFC/g de Coliformes totais (Coliformes a 35° C) e  $5,00 \times 10^2$  UFC/g de Coliformes termotolerantes (Coliformes a 45° C). Apesar da sua importância, a legislação não estabelece um limite máximo para a presença de microrganismos Mesófilos aeróbios totais em amostras de QMA.

## **1.5 Análises microbiológicas**

A análise microbiológica é capaz de informar quais os microrganismos presentes, bem como a quantidade desses em um determinado produto, tornando-se uma metodologia importantíssima capaz de trazer informações que assegurem a qualidade de alimentos e a segurança do seu consumo. A avaliação microbiológica é capaz de identificar possíveis falhas que podem ocorrer durante todo o processo de produção de um alimento, que podem acarretar o aparecimento de bactérias que apresentam riscos à saúde (BRASIL, 2010). É possível também avaliar o tempo vida útil do produto, e se os critérios microbiológicos exigidos pela legislação que estabelece padrões específicos para diversos tipos de alimentos estão sendo atendidos de forma adequada (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Existem diversas metodologias utilizadas para determinação quantitativa e qualitativa de microrganismos presentes nos alimentos descritas na literatura. O método mais adequado é avaliado segundo o tipo de amostra que será analisada, microrganismos que serão estudados, recursos disponíveis, e, além disso, a metodologia deve seguir os critérios descritos na legislação (PELCZAR JR. et al., 1996; SILVA 2007).

Coliformes totais pertencem a um grupo que engloba várias espécies de bactérias, caracterizadas por serem bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporulados, capazes de fermentar lactose com produção de gás na temperatura de 35 °C ( $\pm 5$ ) no período entre 24 a 48 horas. São bactérias que podem ser encontradas na microbiota do trato gastrointestinal do homem e de alguns animais (JAY, 2005; PINTO, 2009).

A presença desses microrganismos em grande quantidade é um indicativo de possível contaminação fecal e ocorrência de patógenos, ou ainda de falhas nas condições de higiene empregadas na fabricação, armazenamento, transporte e contaminação ambiental. Quando presentes em um alimento, não são necessariamente um indicativo de contaminação fecal, pois dentro do grupo coliformes totais existem também bactérias que podem ser encontradas em diversos ambientes naturais como solo e vegetais (JAY, 2005; SILVA et al., 1997). Microrganismos pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsilla* e *Serratia* são alguns exemplos de Coliformes totais que podem não apresentar origem entérica. (HAJDENWURCEL, 1998; SILVA, 2007).

As bactérias pertencentes ao grupo Coliformes termotolerantes distinguem-se das bactérias Coliformes totais, por serem capazes de fermentar lactose com produção de gás em uma temperatura de 44,5 °C ( $\pm 0,2$ ), entre 24 e 48 horas (APHA, 2001). O principal microrganismo representante desse grupo é a *Escherichia coli*, considerada um indicador específico de contaminação fecal e da possível presença de outros organismos potencialmente patogênicos em alimentos (VANETTI, 2003). Quando presentes na microbiota gastrointestinal do homem, os coliformes não oferecem riscos para saúde, porém, a contaminação de um alimento por *E. coli* indica o risco de presença de patógenos entéricos, sendo que a sua ingestão pode causar quadros de toxinfecções (HAJDENWURCEL, 1998; SILVA, 2007). Segundo o Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos, fornecido pelo Ministério da Saúde, as infecções por *Escherichia coli* enterotoxigênica, podem causar diarreia intensa, febre e desidratação (BRASIL, 2010).

Os valores da contagem dos coliformes a 35°C (coliformes totais) e a 45°C (coliformes termotolerantes) em Queijos Minas Artesanais da região do Cerrado devem atender aos padrões determinados na Portaria nº 1837, de 5 de julho de 2018, do IMA, para garantir a inocuidade do alimento dos consumidores (MINAS GERAIS, 2018).

Diferente dos Coliformes totais e termotolerantes, os microrganismos Mesófilos aeróbios totais não possuem um limite máximo determinado por lei na determinação da qualidade microbiológica de QMA. Esse grupo de microrganismos é representado por bactérias que apresentam temperatura ideal de multiplicação em torno de 30°C.

Apesar de não ser exigida a contagem dessas bactérias na legislação que estabelece os padrões microbiológicos para o QMA, essas são muito importantes na determinação da qualidade desse alimento quando associada a contagem de outros grupos de microrganismos indicadores de contaminação. Apenas a contagem de Mesófilos aeróbios totais não é capaz de indicar possíveis contaminações em alimentos fermentados como o queijo, onde é normal a presença desses microrganismos mas, essas bactérias são de grande importância na análise da viabilidade do consumo do alimento, quando associadas a análise de outros microrganismos indicadores de contaminação como as bactérias Coliformes totais e termotolerantes, pois além de serem parte da microbiota natural do queijo os Mesófilos aeróbios totais contemplam uma grande parte dos organismos contaminantes em alimentos de origem animal (SIQUEIRA, 1995; SILVA, 2007).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

Realizar a contagem de Coliformes totais (a 35°C), Coliformes termotolerantes (a 45°C) e Mesófilos aeróbios totais em amostras de Queijo Minas Artesanal produzidas na microrregião do Cerrado, assim como no leite e no soro-fermento utilizados na sua fabricação.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar a contagem de Coliformes totais (a 35°C), Coliformes termotolerantes (a 45°C) e Mesófilos aeróbios totais em amostras de leite e do soro fermento utilizados na produção de Queijo Minas Artesanal da microrregião do Cerrado;
- Determinar a concentração dos microrganismos Coliformes totais (a 35°C), Coliformes termotolerantes (a 45°C) e Mesófilos aeróbios totais em Queijo Minas Artesanal do Cerrado em diferentes períodos de maturação (tempo 1, 7, 10, 14 e, 22 dias);

### **3 MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1 Local de trabalho**

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Biotecnologia (IBTEC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), campus Patos de Minas.

#### **3.2 Obtenção das amostras**

Amostras de QMA, leite cru e soro-fermento foram coletadas em onze propriedades localizadas na microrregião do Cerrado, cadastradas e selecionadas aleatoriamente pela EMATER de Patos de Minas, durante os meses de outubro e novembro de 2019, que correspondem ao período das chuvas na região. O QMA de cada produtor foi analisado com 1, 7, 10, 14 e 22 dias de fabricação. As amostras coletadas foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo até o Laboratório de Microbiologia, onde foram analisadas individualmente.

#### **3.3 Preparo das amostras**

Com o auxílio de pinças, esterilizadas, foram retirados e pesados 25 gramas (g) de cada amostra de QMA, e em seguida, foram trituradas em um liquidificador, com copo previamente esterilizado, por um período máximo de 3 minutos, para evitar o aquecimento excessivo. Foram então adicionados a 250 mililitros (mL) de água peptonada (Acumedia), obtendo-se a diluição ( $10^{-1}$ ). Posteriormente, para obter novas diluições decimais, 1 mL da primeira diluição foi adicionado a mais 9 mL de água peptonada. O preparo das amostras de leite cru e soro-fermento foram realizados de maneira semelhante, entretanto, foram medidos 25 mL de cada amostra e adicionados 250 mL de água peptonada. As diluições foram selecionadas em função do nível estimado de contaminação, de forma a serem obtidas placas contendo entre 15 e 150

unidades formadoras de colônias (UFC) para Coliformes totais e Coliformes termotolerantes e de 25 a 250 UFC para Mesófilos aeróbios totais.

### **3.4 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com as metodologias contidas na Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que dispõe dos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003). Os parâmetros microbiológicos do queijo foram analisados de acordo com a Portaria nº 1837, de 5 de julho de 2018, do IMA (MINAS GERAIS, 2018). Dessa forma as amostras de soro-fermento, leite cru e QMA foram analisados microbiologicamente realizando-se a contagem de Coliformes totais (Coliformes a 35°C), contagem de Coliformes termotolerantes (Coliformes a 45°C) e a contagem de Mesófilos aeróbios totais.

#### **3.4.1 Contagem de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes**

O teste presuntivo foi realizado em ágar cristal violeta bile lactose (VRBA, Acumedia) que, possui sais biliares e cristal violeta, componentes responsáveis pela inibição do crescimento de microrganismos Gram-positivos, e o vermelho neutro, um indicador de pH que revela a fermentação da lactose pelos microrganismos presentes na amostra (BRASIL, 2003). As diluições das amostras selecionadas foram inoculadas em placas de Petri, e em seguida foi adicionado o meio VRBA previamente fundido e mantido a 46 °C ( $\pm 2$ ) em banho-maria. As placas foram cuidadosamente homogeneizadas e deixadas em repouso até a solidificação do meio. Em seguida, adicionou-se uma sobrecamada, de cerca de 10 mL do meio, para evitar o crescimento e espalhamento de colônias na superfície. Após a completa solidificação do meio, as placas foram incubadas em posição invertida a 35°C ( $\pm 1$ ), por período de 18 a 24 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas as placas que continham entre 15 e 150 colônias para contagem de colônias típicas e atípicas. As colônias típicas apresentaram coloração rósea, de 0,5 a 2 mm de diâmetro, rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio. Anotaram-se os resultados de contagem, os quais foram registrados separadamente por tipo de colônia.

A confirmação da presença de Coliformes totais foi realizada a partir da inoculação de colônias típicas e atípicas em caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL 2%, Himedia), em tubos de ensaio que continham em seu interior tubos de Durham invertidos. Em seguida, os tubos foram incubados a 36 °C ( $\pm 1$ ) em banho-maria com circulação de água por um período de 24 a 48 horas. O caldo VBBL, apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante) responsáveis pela inibição de microrganismos Gram-positivos (BRASIL, 2003). Os tubos de Durham funcionam como coletores de gás e, a presença de gás evidenciada pela produção de bolhas em seu interior, comprova que houve fermentação da lactose e, portanto, evidencia a presença de coliformes totais. Assim foram considerados positivos os tubos de ensaio que apresentaram efervescência quando agitados delicadamente e formação de bolhas dentro tubo de Durham.

A confirmação da presença de Coliformes termotolerantes foi realizada através da inoculação de colônias típicas e atípicas em tubos de ensaio que continham em seu interior tubos de Durham invertidos e caldo Escherichia Coli (EC, Himedia), incubados a 45 °C ( $\pm 0,2$ ), em banho-maria com circulação de água, por um período de 48 horas. O caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere uma capacidade tamponante impedindo a sua acidificação. A seletividade é devido à presença de sais biliares responsáveis pela inibição de microrganismos Gram-positivos (BRASIL, 2003). Após o período de incubação foi feita a avaliação dos tubos de ensaio, e aqueles que apresentaram efervescência quando agitados delicadamente e formação de bolhas dentro tubo de Durham evidenciaram a fermentação da lactose presente no meio, e portanto, foram considerados positivos.

#### 3.4.2 Contagem de Mesófilos aeróbios totais

Para a quantificação de bactérias Mesófilas aeróbias totais foi adotado o método de contagem direta em placas. As diluições das amostras selecionadas foram inoculadas em placas de Petri, contendo Agar para Contagem Padrão (PCA). Após a absorção do inóculo, as placas foram incubadas em posição invertida a 36 °C ( $\pm 1$ ) por 48 horas. Após o período de incubação placas que continham entre 25 e 250 UFC, foram selecionadas para a contagem de todas as colônias presentes (BRASIL 2003; SALES 2015).

### 3.5 Análise estatística

Para realizar a análise estatística dos resultados foi utilizado o software Graph Pad Prism (v.6). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados das análises microbiológicas encontrados para cada um dos 11 produtores foram considerados como repetições. Foram calculadas as médias, medianas, log das medianas e o coeficiente de variação (CV) dos valores obtidos nas análises das amostras de leite cru e soro-fermento. Para as amostras de QMA, esses cálculos foram realizados para cada período de maturação analisado (1, 7, 10, 14 e 22 dias), sendo os valores comparados entre si através do teste ANOVA, e pós-teste de Tukey para variáveis paramétricas (médias), e pós teste de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas (medianas). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1 Coliformes totais (a 35 °C) e Coliformes termotolerantes (a 45 °C)

Os resultados da contagem de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes presentes nas amostras de leite cru e soro-fermento, utilizados na fabricação de QMA da microrregião do Cerrado estão descritos na Tabela 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1-** Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de Coliformes totais (a 35°C) observados em amostras de leite cru e soro-fermento, utilizados na fabricação de Queijo Minas Artesanal do Cerrado.

Amostra	Média (UFC/mL)	Mediana (UFC/mL)	CV (%)
Leite cru	$< 8,20 \times 10^3$ est.	$< 1,00 \times 10^1$ est.*	315,5
Soro-fermento	$1,40 \times 10^5$	$3,90 \times 10^4$	145,2

\* est.: valor estimado.

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 2-** Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de Coliformes termotolerantes (a 45°) observados em amostras de leite cru e soro-fermento, utilizados na fabricação de Queijo Minas Artesanal do Cerrado.

Amostra	Média (UFC/mL)	Mediana (UFC/mL)	CV (%)
Leite cru	$< 1,00 \times 10^1$ est.	$< 1,00 \times 10^1$ est.*	112,4
Soro-fermento	$1,30 \times 10^5$	$4,00 \times 10^3$	156,3

\* est.: valor estimado.

Fonte: Próprio autor

Na avaliação de Coliformes totais e termotolerantes, das onze amostras de leite cru analisadas, dez não apresentaram crescimento microbiano, resultando em um valor mediano de  $<1,00 \times 10^1$  est. UFC/mL. Em todas as amostras que não apresentaram desenvolvimento de colônias foram adotados valores referentes ao limite de detecção do experimento, ou seja, o valor que representa a menor quantidade de microrganismos que pode ser detectado em uma amostra referente às diluições utilizadas (BRASIL, 2003).

Mesmo não sendo exigido por lei um limite para presença dos grupos de Coliformes totais e termotolerantes no leite cru utilizado na produção de QMA, valores altos nas contagens desses microrganismos são indicativos de alerta para deficiências no processo de ordenha, manipulação, e armazenamento do leite (ARCURI et al., 2006). De acordo com Borelli et al. (2006), das amostras de leite cru utilizadas na fabricação do queijo Canastra, 40 % apresentaram valores menores que 0,3 número mais provável por mL (NMP/mL), enquanto 60% das amostras variaram de 2,3 NMP/mL a 24 NMP/mL.

Em Minas Gerais, a legislação propõe a enumeração de *E. coli* em um limite de  $1 \times 10^2$  UFC/mL para o leite cru utilizado na fabricação do QMA (MINAS GERAIS, 2002), sendo essa a principal espécie do grupo dos coliformes relacionada à contaminação de alimentos. Sales (2015), observou contagens de  $8,8 \times 10^3$  UFC/mL para Coliformes totais e  $6,8 \times 10^1$  UFC/mL para *E. coli* na análise do leite cru da região de Araxá. Apesar da metodologia aplicada no presente trabalho permitir apenas a detecção e contagem de Coliformes totais e termotolerantes, os resultados permitem concluir que as amostras de leite cru analisadas estão dentro dos parâmetros legais, sem indicativo de contaminação por microrganismos de origem fecal.

Para as amostras de soro-fermento os resultados obtidos demonstram uma contagem elevada com valores medianos de  $3,90 \times 10^4$  UFC/mL para Coliformes totais e  $4,00 \times 10^3$  UFC/mL para Coliformes termotolerantes. Diferente do QMA que apresenta valores máximos desses grupos de microrganismos permitidos pela legislação, o soro-fermento não possui padrões exigidos por lei. Porém é importante avaliá-lo, pois concentrações elevadas de Coliformes totais e termotolerantes indicam uma possível contaminação por bactérias de origem ambiental e fecal. Resultados similares foram encontrados por Martins (2006) com valores médios de 3,08 Log UFC/mL para Coliformes totais e Figueiredo (2018) afirma que 40 % das amostras

analisadas em seu trabalho apresentavam valores maiores que 3,00 Log NMP/mL para Coliformes totais e termotolerantes, na avaliação microbiológica do soro-fermento utilizado na região do Serro.

Nas Tabelas 3 e 4 são apresentadas a média, a mediana e coeficiente de variação (CV %) das contagens de Coliformes totais (a 35°C) e termotolerantes (a 45°), respectivamente, presentes nas amostras de QMA da região do Cerrado em diferentes dias de maturação.

**Tabela 3-** Média, mediana e coeficientes de variação (CV) da contagem de Coliformes totais (a 35°C) observados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado durante o período de maturação.

<b>Dia de Maturação*</b>	<b>Média** (UFC/g)</b>	<b>Mediana*** (UFC/g)</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1</b>	1,87 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	4,50 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	154,4
<b>7</b>	1,28 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	1,26 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	184,7
<b>10</b>	4,42 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	5,70 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	198,6
<b>14</b>	1,54 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	1,10 x 10 <sup>3</sup> <sup>B</sup>	126,8
<b>22</b>	3,94 x 10 <sup>2</sup> <sup>A</sup>	1,90 x 10 <sup>2</sup> <sup>B</sup>	105,0

\*limite permitido pela legislação de 5,00 x 10<sup>3</sup> UFC/g para coliformes 35°C (PORTARIA IMA N° 1837, de 5 de julho de 2018); \*\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); \*\*\*Medianas seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskall-wallis (p<0,05).

**Fonte:** Próprio autor.

**Tabela 4-** Média, mediana e coeficientes de variação (CV) da contagem de Coliformes termotolerantes (a 45°C) observados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado durante o período de maturação.

<b>Dia de Maturação*</b>	<b>Média** (UFC/g)</b>	<b>Mediana*** (UFC/g)</b>	<b>CV (%)</b>
<b>1</b>	2,00 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	4,50 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	137,7
<b>7</b>	1,20 x 10 <sup>5</sup> <sup>A</sup>	9,10 x 10 <sup>3</sup> <sup>AB</sup>	194,4
<b>10</b>	4,40 x 10 <sup>4</sup> <sup>A</sup>	5,50 x 10 <sup>3</sup> <sup>B</sup>	206,1
<b>14</b>	1,26 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	3,53 x 10 <sup>2</sup> <sup>BC</sup>	165,8
<b>22</b>	3,68 x 10 <sup>3</sup> <sup>A</sup>	1,80 x 10 <sup>2</sup> <sup>C</sup>	117,3

\*limite permitido pela legislação de 5,00 x 10<sup>2</sup> UFC/g para coliformes 45°C (PORTARIA IMA N° 1837, de 5 de julho de 2018) \*\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05); \*\*\*Medianas seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskall-wallis (p<0,05).

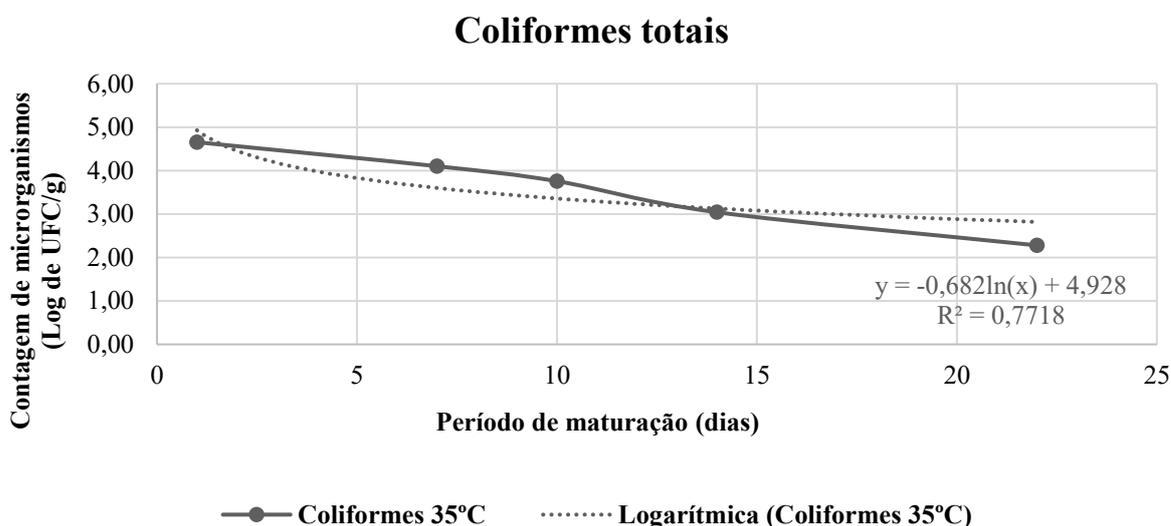
**Fonte:** Próprio autor.

Os valores medianos nas contagens de Coliformes a 35°C nos primeiros dez dias de maturação foram entre 4,50 x 10<sup>4</sup> UFC/g e 5,70 x 10<sup>3</sup> UFC/g. Valores semelhantes foram observados para as contagens de Coliformes a 45°C, que variaram entre 4,50 x 10<sup>4</sup> UFC/g e 5,50 x 10<sup>3</sup> UFC/g nos primeiros dez dias de maturação. Esses dados demonstram que até o 10º dia de maturação as contagens de Coliformes totais e termotolerantes permaneceram acima do limite exigido pela legislação, que é de 5,00 x 10<sup>3</sup> UFC/g de Coliformes a 35° C e 5,00 x 10<sup>2</sup> UFC/g de Coliformes a 45° C (MINAS GERAIS, 2018). Contudo, as contagens atingiram os parâmetros exigidos pela legislação vigente no 14º dia de maturação, apresentando valores

medianos de  $1,00 \times 10^3$  UFC/g e  $3,53 \times 10^2$  UFC/g para Coliformes totais e termotolerantes, respectivamente.

A alta contagem inicial de microrganismos do grupo dos coliformes pode ser em decorrência da qualidade microbiológica do soro-fermento utilizado na fabricação do QMA do Cerrado. Entretanto, ainda há outros fatores que podem estar relacionados à contaminação por este grupo de microrganismos como, o processamento e manipulação inadequados, contaminação dos utensílios e equipamentos e a falta de higiene dos manipuladores do produto. Além disso, os valores encontrados demonstram que ao longo da maturação o número de microrganismos que pertencem aos grupos de Coliformes totais e termotolerantes tendem a diminuir. Isso pode ser observado nas Figuras 1 e 2, que evidenciam a influência do período de maturação na redução da quantidade de bactérias indesejáveis, auxiliando assim a segurança do alimento. A diminuição de bactérias durante o processo de maturação é consequência de fatores responsáveis pela inibição da multiplicação desses microrganismos como, por exemplo, a diminuição da umidade do alimento (perda de água), aumento da concentração de sólidos totais e produção ácidos orgânicos. (BERESFORD et al., 2001).

**Figura 1.** Evolução da contagem mediana de Coliformes totais (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado até 22 dias de maturação.

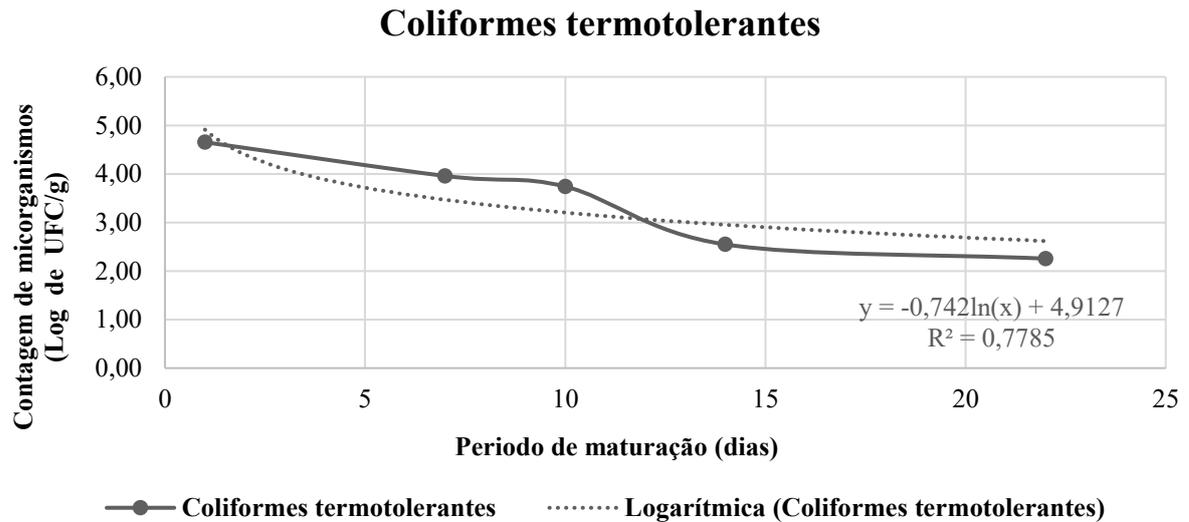


Fonte: Próprio autor.

Em comparação com outros trabalhos, os resultados aqui apresentados se assemelham ao estudo feito por Martins (2006), no qual foi demonstrado que o QMA da região do Serro atingiu o parâmetro de contagem exigido pela legislação de  $5,00 \times 10^2$

$10^3$  UFC/g para Coliformes a 35°C no 13º dia de maturação. O trabalho de Dorez (2007), indicou que no 10º dia de maturação, o QMA da Canastra já atendia aos parâmetros exigidos para este grupo de microrganismos, e o estudo realizado por Sales (2015) com QMA de Araxá, indicou o 7º dia como o período ideal de maturação.

**Figura 2.** Evolução da contagem mediana de Coliformes termotolerantes (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado até 22 dias de maturação.



Fonte: Próprio autor.

Para os Coliformes termotolerantes, o trabalho de Martins (2006) mostrou resultados indicando que no 17º dia de maturação o QMA do Serro atende aos parâmetros exigidos de  $5,00 \times 10^2$  UFC/g para contagem de Coliformes termotolerantes. Já o estudo feito por Dorez (2007) demonstrou em suas análises que no 13º dia de maturação os queijos da Canastra já atendiam aos padrões exigidos. Em contraste a todos estes resultados, Sales (2015) aponta que os parâmetros necessários para coliformes a 45°C exigidos por lei são atingidos logo no primeiro dia de maturação.

Os estudos mencionados apresentam períodos de maturação ideais diferentes dos apresentados por este trabalho. Contudo, em todos os estudos citados, assim como neste trabalho, o número de microrganismos diminuiu ao longo dos dias de análise. A determinação da concentração dos coliformes totais em QMA assume importância como parâmetro indicador da possibilidade da existência de microrganismos potencialmente patogênicos, nocivos à saúde humana. Coliformes totais representam uma classe de bactérias encontradas em locais como o meio ambiente e a microbiota intestinal de mamíferos, incluindo humanos. Com isso, quando essa classe de bactérias é encontrada em quantidades superiores a  $5,00 \times 10^3$  UFC/g em QMA,

podem indicar uma possível contaminação por microrganismos prejudiciais à saúde, e responsáveis pela transmissão de doenças (BRASIL, 2008).

Todavia, a avaliação do número de Coliformes termotolerantes é mais precisa quanto à indicação de falhas sanitárias na produção de alimentos. A presença de valores maiores que  $5,00 \times 10^2$  UFC/g para Coliformes termotolerantes indicam que o produto em questão não é próprio para consumo, e, portanto, não deve ser comercializado (MINAS GERAIS, 2018). A comercialização de QMA com altas contagens desses microrganismos apresentam um risco potencial à saúde dos consumidores, podendo ocasionar casos clínicos de infecção e intoxicação. Isso pode ser explicado pelo fato dessas bactérias apresentarem como habitat natural principal o intestino de animais de sangue quente. Sendo assim, quando observadas em quantidades superiores ao limite máximo permitido, indicam que o alimento pode conter contaminação de origem fecal e conseqüentemente pode trazer danos à saúde (SIQUEIRA, 1995; SILVA, 2007).

A contaminação do QMA por Coliformes totais e termotolerantes pode ocorrer em diversos momentos, uma vez que o processo utilizado para produzir queijos artesanais inclui diversas etapas de manipulação (MARTINS, 2006). Outro ponto relevante é o uso tradicional do leite *in natura*, isso significa que o leite utilizado na produção não passa por nenhum tratamento térmico que possa eliminar a presença de possíveis organismos potencialmente patogênicos.

Além disso, o soro-fermento, ingrediente importante que fornece características típicas para esse queijo, mas, se for armazenado e/ou manuseado de maneira incorreta se torna também uma possível fonte de contaminação para esse produto de origem tradicional. A falta de padronização no processo de salga dos queijos afeta diretamente o teor de sal encontrado no pingo e isso também pode afetar a microbiota desse fermento natural (CARR et al., 2002).

Assim, a manutenção de boas práticas de higiene na obtenção, manuseio e armazenamento desse ingrediente tão importante para produção do QMA devem ser seguidas corretamente pelos produtores a fim de diminuir a chance de contaminação do seu produto. Contudo, mesmo com o número alto de bactérias contaminantes encontradas nas amostras, acredita-se que exista uma predominância de bactérias ácido lácticas no soro-fermento (FURTADO et al., 2003), o que leva a uma diminuição do pH, tornando o ambiente impróprio para a maioria dos microrganismos deterioradores e potencialmente patogênicos (BERESFORD et al., 2001). Por esses fatores além do

queijo, analisar as amostras do leite e soro-fermento usados na fabricação dos queijos artesanais foi fundamental para determinar as características microbiológicas desse alimento (SILVA, 1997; DORES 2007).

#### 4.2 Mesófilos aeróbios totais

Os resultados da contagem de Mesófilos aeróbios totais presente nas amostras de leite cru e soro-fermento, utilizados na fabricação de QMA da microrregião do Cerrado estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5-** Média, mediana e coeficiente de variação (CV) de Mesófilos aeróbios totais observados em amostras de leite cru e soro-fermento, utilizados na fabricação de Queijo Minas Artesanal do Cerrado.

Amostra	Média (UFC/mL)	Mediana (UFC/mL)	CV (%)
Leite cru	< 1,00 x 10 <sup>1</sup> est.	< 1,00 x 10 <sup>1</sup> est.*	322,2
Soro-fermento	8,10 x 10 <sup>7</sup>	1,67 x 10 <sup>7</sup>	141,6

\* est.: valor estimado.

Fonte: Próprio autor.

Não houve valor expressivo na contagem de Mesófilos aeróbios totais nas amostras de leite cru. Para as amostras sem crescimento bacteriano foi adotado o valor referente ao limite de detecção, resultando no valor mediano estimado de 1,00 x 10<sup>1</sup> UFC/mL (BRASIL, 2003). Não existe padrão microbiológico estabelecido para contagem de Mesófilos aeróbios totais no leite utilizado para produção de QMA mas, a maioria dos estudos encontrados na literatura sobre a qualidade microbiológica do leite cru apresenta valores expressivos, em média 1,00 x 10<sup>3</sup> UFC/mL para contagem de bactérias mesófilas aeróbicas e contagem bacteriana total (CBT), que engloba os Mesófilos aeróbios totais. Os resultados descritos por Oliveira (2014), sobre a avaliação de amostras de leite cru da região de São João Del Rei, exibem valores de contagem consideráveis, em média 4,20 x 10<sup>3</sup> UFC/mL, para CBT. Souza et., al (2009) avaliaram amostras de leite cru no município de Sacramento, Minas Gerais, e os valores também foram bastante expressivos, com contagens de Mesófilos aeróbios totais entre 6,2 x 10<sup>2</sup> UFC/mL e 2,2 x 10<sup>7</sup> UFC/mL. Ao passo que, os resultados do presente trabalho, se mostraram divergentes aos estudos mencionados. Os valores das médias e medianas foram pouco expressivos e sugerem que o leite cru não apresenta risco de contaminação para o queijo do Cerrado.

No entanto, as contagens de Mesófilos aeróbios totais nas amostras do soro-fermento se mostraram elevadas, com mediana de 1,67 x 10<sup>7</sup> UFC/mL. Segundo Furtado (1990), as bactérias

láticas são os principais microrganismos encontrados no pingo, o que pode explicar a prevalência de altas contagens de microrganismos Mesófilos aeróbios totais nas amostras avaliadas. Mas ainda há outro motivo relacionado à grande concentração de Mesófilos aeróbios totais que poderia estar relacionado com a presença de bactérias deteriorantes, uma vez que os resultados das contagens dos Coliformes a 35°C e a 45°C também foram elevados. Assim, além das bactérias láticas que comumente são encontradas em fermentos lácticos, como o pingo, há indicativos de possível contaminação por microrganismos indesejáveis nas amostras de soro-fermento analisadas.

Novamente, para mensurar a influência de diferentes períodos de maturação na contagem de microrganismos presentes no QMA do Cerrado, foram realizadas as contagens de Mesófilos aeróbios totais nos dias 1, 7, 10, 14 e 22, e os valores de médias e medianas foram apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6-** Média, mediana e coeficientes de variação (CV) da contagem de Mesófilos aeróbios totais observados em amostras de Queijo Minas Artesanal do Cerrado durante o período de maturação.

<b>Dia de maturação</b>	<b>Média* (UFC/g)</b>	<b>Mediana**(UFC/g)</b>	<b>CV(%)</b>
<b>1</b>	2,30 x 10 <sup>8</sup> <sup>A</sup>	2,90 x 10 <sup>8</sup> <sup>A</sup>	64,90
<b>7</b>	4,45 x 10 <sup>8</sup> <sup>A</sup>	2,90 x 10 <sup>8</sup> <sup>A</sup>	155,8
<b>10</b>	5,00 x 10 <sup>8</sup> <sup>A</sup>	2,90 x 10 <sup>8</sup> <sup>A</sup>	87,84
<b>14</b>	2,20 x 10 <sup>8</sup> <sup>A</sup>	6,93 x 10 <sup>7</sup> <sup>A</sup>	217,8
<b>22</b>	3,40 x 10 <sup>7</sup> <sup>A</sup>	3,00 x 10 <sup>7</sup> <sup>B</sup>	57,43

\*Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05);

\*\*Medianas seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis (p<0,05).

**Fonte:** próprio autor.

Os resultados da análise das amostras de QMA do Cerrado demonstram valores expressivos para Mesófilos aeróbios totais, com valores medianos máximos de 2,90 x 10<sup>8</sup> e mínimos de 3 x 10<sup>7</sup>. Essa concentração de microrganismos está relacionada a presença de BAL e são também um indicativo de alerta para possível presença de organismos contaminantes, levando em consideração as altas contagens iniciais (até o 10º dia de maturação) das bactérias pertencentes aos grupos Coliformes totais que apresentaram valores de contagem entre 4,50 x 10<sup>4</sup> UFC/g a 5,70 x 10<sup>3</sup> UFC/g e Coliformes e termotolerantes entre 4,50 x 10<sup>4</sup> UFC/g a 5,50 x 10<sup>3</sup> UFC/g. Não há padrões exigidos por lei para contagem de microrganismos mesófilos em Queijos Minas Artesanais. Contudo, a contagem dessas bactérias é de grande importância na

determinação da qualidade do alimento quando associada a contagem de outros microrganismos indicadores.

Esse grupo de microrganismos engloba bactérias benéficas para saúde, além de serem fundamentais na determinação das características do sabor e aroma dos queijos e contribuírem para inibição do crescimento de bactérias indesejáveis nos queijos, durante o processo de maturação (CARR et al., 2002). As bactérias ácido lácticas (BAL) estão incluídas dentre os Mesófilos aeróbios totais e estão presentes naturalmente na microbiota dos queijos (PERRY, 2004).

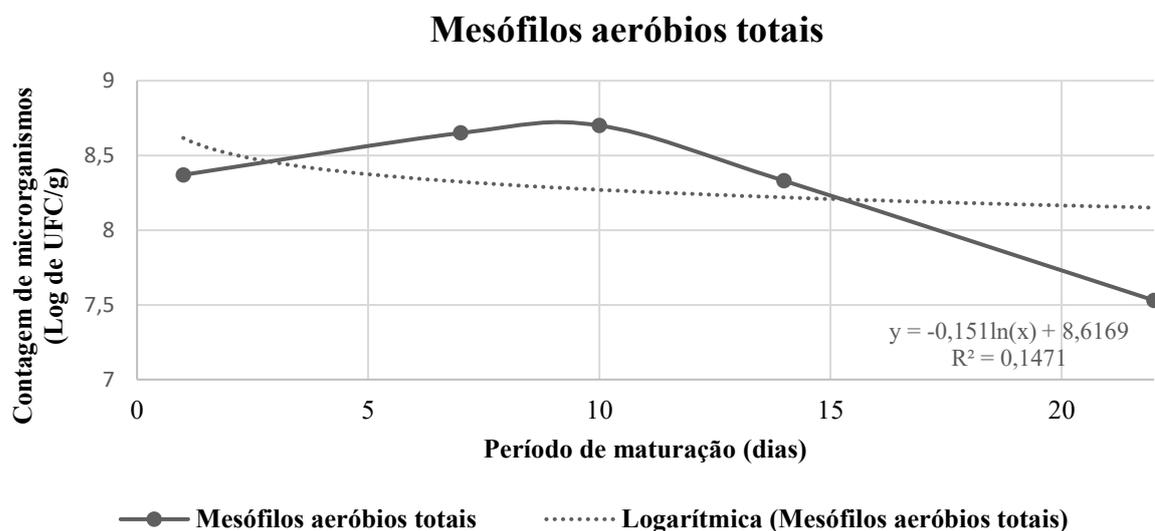
As condições de inibição, no decorrer do processo de maturação ocorrem principalmente por conta da competitividade entre as BAL e outras classes de bactérias presentes. BAL são capazes de prevalecer em relação às demais, pois são mais adaptadas ao ambiente, pela produção de ácido láctico, diminuição dos açúcares disponíveis, do potencial de oxirredução e pela produção de enzimas antimicrobianas (CARIDI et al., 2003).

Mas, é importante destacar que nem todas as bactérias mesófilas aeróbicas são benéficas. Surge um alerta quando esse grupo de microrganismos é encontrado em quantidades elevadas, nesse caso passam a ser um indicativo de possível contaminação do queijo por bactérias patogênicas que podem trazer prejuízo a saúde dos consumidores (BERESFORD et al., 2001).

Valores de contagens consideráveis, porém menores que os valores encontrados neste estudo, foram observados por Wolupeck et al. (2012), na análise da qualidade microbiológica de queijo Minas, que apresentou média de  $1,00 \times 10^6$  UFC/g para concentração de Mesófilos aeróbios totais. Contudo, resultados próximos aos do presente estudo foram encontrados por Dores (2007), que apresentou valores de contagens elevados entre 7,93 (Log de UFC/g) e 7,36 (Log de UFC/g) na avaliação da presença de mesófilos aeróbios totais em QMA da Canastra, porém, a autora destaca um ponto importante na interpretação de seus resultados, se tratando de um alimento como o queijo, deve-se levar em consideração que a presença de uma microbiota composta por bactérias mesófilas aeróbias pode estar relacionada não só com risco de contaminação por organismos potencialmente patogênicos, mas a uma alta quantidade de bactérias lácticas. Assim, os resultados que podem ser observados na Figura 3, sugerem que a microbiota dos queijos artesanais analisados nesse estudo é possivelmente composta por BAL e microrganismos contaminantes nos primeiros dias de análise, porém, no decorrer da maturação prevalecem as BAL, tendo em vista as alterações físico-química e microbiológicas que ocorrem naturalmente nesse período, o que justifica as contagens elevadas de Mesófilos

aeróbios totais durante todo o período analisado e a diminuição do valor das contagens de Coliformes totais (Figura 1) e Coliformes termotolerantes (Figura 2).

**Figura 3.** Evolução da contagem mediana de Mesófilos aeróbios totais (Log de UFC/g) em Queijo Minas Artesanal do Cerrado até 22 dias de maturação.



Fonte: próprio autor.

## 5 CONCLUSÃO

No presente estudo, os resultados obtidos nas análises microbiológicas em amostras de leite cru não apresentaram contagens expressivas capazes de indicar contaminação do mesmo pelos grupos de microrganismos analisados.

Em contraste, a avaliação do soro-fermento indicou valores elevados para bactérias do grupo Coliformes totais e termotolerantes. O mesmo pode ser observado em relação aos valores obtidos na contagem de Mesófilos aeróbios totais. Não há parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação estadual vigente para o soro-fermento. No entanto, os resultados aqui apresentados em conjunto com trabalhos anteriores, sugerem a importância desses parâmetros para assim acompanhar a qualidade microbiológica desse ingrediente tão importante na produção do QMA.

Quanto ao resultado da avaliação do QMA do Cerrado os microrganismos Coliformes totais e termotolerantes, avaliados nas amostras, exibiram contagens maiores do que o limite permitido até o 10º dia de maturação, e após esse período em

decorrência de fatores relacionados às mudanças que ocorrem no alimento durante a maturação, as contagens bacterianas diminuíram e atingiram o padrão designado pela legislação no 14º dia de maturação.

Contudo, torna-se necessária a avaliação da presença de outros microrganismos exigidos pela legislação bem como a realização de análises físico-química para determinar a segurança do alimento para determinar o período ideal de maturação para comercialização do Queijo Minas Artesanal do Cerrado.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. Compendium for methods for microbiological examination of foods. Washington. D.C.: 2001.

AYCICEK, H.; OGUZ, U.; KARCI, K. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers In: ANKARA, Turkey. International Journal of Hygiene and Environmental Health., 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L. et al. Recent advances in cheese microbiology. Int. Dairy J., v.11, 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. (Ed.). Cheese chemistry, physics and microbiology, 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. Food Microbiology, London, 2003.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology. v. 28, n. 4, 2002.

BOZO, G. A. et al. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2013.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; et al. Enterotoxigenic Staphylococcus spp. and other microbial contaminants during production of canastra cheese, Brazil, MG. Brazilian Journal of Microbiology, 2006.

DORES, M. T. Queijo Minas Artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

EMATER. Ações Extensionistas para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Revista da EMATER – MG. Ano XXII – Nº 77. Julho de 2003.

EMATER. Queijo Minas Artesanal: Tradição e Qualidade que Revelam Minas. Revista da EMATER – MG. Ano XXII – Nº 80. Agosto de 2004.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). Caracterização da microrregião do Alto Paranaíba como produtora tradicional de Queijo Minas Artesanal. Patos de Minas, MG. 2003. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em 21 de julho de 2019.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). Programa do Queijo Minas Artesanal, 2017. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br>. Acesso em 21 de julho de 2019.

FERREIRA, C. L. L. F. Queijo: Mineiros tentam ajustar modernidade e produção artesanal. Revista Globo Rural, 2002.

FIGUEIREDO, R. C. Perfil Socioeconômico de Agricultores Familiares e Caracterização de Queijo Minas Artesanal da Serra do Salitre em Diferentes Períodos de Maturação e Épocas do Ano. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) 2. Caracterização e qualidade do Queijo Minas Artesanal – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2018.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. Microbiologia de alimentos. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.

FURTADO, M.M. Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e de soro de queijo da Região do Serro, Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1990.

FURTADO, M. M.; MOSQUIM, M. C. A. V.; FERNANDES, A. R.; DA SILVA, C. A. B. Produção de queijo Minas curado e meia-cura, 2003.

GIANNINO, M.L. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture independent methods. Int. J. Food Microbiol., 2009.

HAJDENWURCEL, J.R. Atlas de microbiologia de alimentos. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Queijo artesanal de minas, patrimônio cultural do Brasil, 2006.

ICMSF. Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos. Guia simplificado para a compreensão e uso de objetivos de inocuidade de alimentos e objetivos de desempenho, 2006.

JAY, J.M., Microbiologia de alimentos. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia, 2005.

LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2009.

MARTINS, J. M. Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do Queijo Minas Artesanal da região do Serro. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o Processo de Produção de Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864, de 01 de agosto de 2008. Altera o Regulamento da Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o Processo de Produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2008.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Portaria nº 2016, de 26 de novembro de 2020. Identifica a Região Serras da Ibitipoca como Produtora do Queijo Minas Artesanal e Revoga a Portaria IMA nº 1834, de 04 de julho de 2018. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2020.

MINAS GERAIS. Decreto no 42.645, de 5 de junho de 2002. Aprova o regulamento da lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Diário do Executivo, Belo Horizonte, 2002.

MINAS GERAIS. Lei 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo, Belo Horizonte, 2012.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Portaria nº 1837, de 5 de julho de 2018. Dispõe sobre o Processo de Produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2018.

MINAS GERAIS. Lei no 23.157, de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo, Belo Horizonte, 2018.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minas frescal e muçarela. Pirassununga, 2008.

OLIVEIRA, L. G. Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de Queijo Minas Artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

PELCZAR JR, M.J; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1997.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Quim. Nova, vol. 27, 2004.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. L. F.; MARTINS, J. M. et al. Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. Pesq. Agropec. Trop., Goiânia, 2009.

QUEIJO Minas Artesanal: Guia técnico para a implantação de boas práticas de fabricação em unidades de produção do queijo minas artesanal. Belo Horizonte: OCEMG/SESCOOP/UFV/Emater-MG, 2009.

RESENDE, M. F. S. Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas. Dissertação (Mestrado), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

SÁ, J. F. O.; Caracterização microbiológica de doce de leite, leite condensado e queijo Minas Padrão por metodologia clássica e padronização de multiplex para detecção de patógenos por PCR em tempo real. 2012, 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

SALES, G. A. Caracterização microbiológica e físico-química de Queijo Minas Artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano. (Mestre em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SILVA, J. G. Características físico-químicas e sensoriais do Queijo Minas Artesanal da Canastra. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SCHEERER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk- tank milk samples of goats and sheep. Veterinary Microbiology, 2004.

COSTA JÚNIOR, L. C. G. et al. Maturação Do Queijo Minas Artesanal Da Microrregião Campo Das Vertentes E Os Efeitos Dos Períodos Seco E Chuvoso. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 69, 2014.

SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SIQUEIRA, R.S. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; CERESER, N. D. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2009.

SPERAT-CZAR, A. Os queijos de leite cru. SertãoBras, 2012. Disponível em: <https://www.sertaobras.org.br>. Acesso em 20 de julho de 2019.

VANETTI, M. C. D. Microrganismos patogênicos em leite. Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo. Viçosa, 2003.

WOLUPECK, H. L. et al. Evolução da qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado em Curitiba (PR) no intervalo de 10 anos (1999 e 2009). Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais, 2012.